

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-247872

(43)公開日 平成6年(1994)9月6日

(51)IntCl. ⁵	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 37/02	A D U	8314-4 C		
	A C S			
9/08	F	7329-4 C		
47/42	G	7433-4 C		

審査請求 未請求 請求項の数 3 F D (全 8 頁)

(21)出願番号 特願平5-57826

(71)出願人 000006699

(22)出願日 平成5年(1993)2月23日

雪印乳業株式会社
北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号

(72)発明者 早坂 仁志
栃木県下都賀郡石橋町大字石橋773-3
S K マンション 2 B

(72)発明者 河島 延行
栃木県下都賀郡石橋町大字下古山231 倉
井マンション 2-C

(72)発明者 上田 正次
埼玉県川越市今福1672-1 メゾンむさし
野719

(74)代理人 弁理士 藤野 清也

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 高濃度TCF製剤

(57)【要約】

【目的】 高濃度TCF製剤の提供。

【構成】 TCFと溶解補助剤を含有する高濃度のTCF製剤溶解補助剤として塩基性アミノ酸、その酸付加塩、またはこれらと有機または無機の塩類とが用いられる。

【効果】 中性付近のpHで等張条件下でTCFを10mg/ml以上の高濃度に溶解することができ、しかも長期間安定に得ることができる。注射液として好適である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 TCFと、塩基性アミノ酸、その酸付加塩及びこれらのアミノ酸類と薬理上許容される有機塩または無機塩とからなる群から選ばれた1種以上の溶解補助剤とを含有することを特徴とする高濃度TCF製剤。

【請求項2】 TCFと、塩基性アミノ酸、その酸付加塩及びこれらのアミノ酸類と薬理上許容される有機塩または無機塩とからなる群から選ばれた1種以上の溶解補助剤とを含有し、ほぼ中性付近のpHを有し等張液となっていることを特徴とする高濃度TCF注射剤。

【請求項3】 溶解補助剤が塩基性アミノ酸のリジンまたはアルギニンである請求項2記載の高濃度TCF注射剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、腫瘍細胞障害因子活性をもつサイトカイン製剤に関する。

【0002】

【従来の技術】腫瘍細胞障害因子 (tumor cytotoxic factor, 以下TCFという) は、本発明者らによってヒト緑線芽細胞培養上清からはじめて見出され、WO90/10651にTCF-Iとして開示されている物質の別称である。この物質は糖タンパク質の一種であって分子量は、未還元状態では約76~80kDa、また還元状態では約52~56kDaの α サブユニットと約30~36kDaの β または β' サブユニットからなるヘテロダイマーである。これは、腫瘍細胞障害因子としての活性のほかに肝細胞増殖因子 (hepatocytogrowth factor; HGF) 活性、スカッター因子 (scatter factor; SF) 活性、腎尿管上皮細胞増殖因子活性、損傷組織修復因子活性、血管内皮細胞増殖因子活性など多様な生物活性を示し、HGFファミリーに属するサイトカインである。TCFがこれらの生理活性を示すことから、これを肝臓疾患治療薬、腎臓疾患治療薬、創傷治療薬、抗腫瘍治療薬として開発することが期待されている。

【0003】しかしながら、TCFは極めて難溶性であるため、水に溶解して投与する製剤、例えば注射製剤とする場合は十分に高濃度の溶液の調製が非常に困難である。このため、医療への実用化に当たっては、少なくとも医療における使用に満足しうる程度の高い濃度のTCF溶液の調製が達成されなければならないことが最大の問題点である。TCFは生体内での代謝速度が早いいため、一回あたりの投与量を高く設定する必要があると考えられている。臨床投与量は成人一人当たり1~10mg/kgと予想される。更に、その製造工程においては、品質確保の点から低温下で高濃度に溶解したTCF原薬と安定化剤等の添加物とを混合して注射製剤のような医療用製剤を調製する必要がある。更に、注射製剤では中性pH、生体との等張性、かつ医療における使用に満足しうる程度の高い濃度のTCF溶液を得る必要がある。

しかし、このような高濃度TCF溶液の調製方法が未だ見出されておらず満足のできる解決技術が提供されていないのが現状である。例えば、注射製剤で汎用されている等張化された生理食塩液は0.15Mの食塩を含有するが、この溶解液に対するTCFの溶解度は、室温では5mg/ml弱であり、しかも不安定であって、経時的に溶解度が低下し、不溶性となる。さらに、低温下では、溶解度が著しく低下し、5℃以下では1mg/ml程度となる。従って、中性pH、等張性であり、かつ低温の条件下においても高い濃度のTCF溶液の調製方法を見出すことが重要な課題である。上記WO90/10651にはTCFの安定性を保持するために、タンパク質、糖質、アミノ酸等を吸着防止剤、あるいは安定剤として含有する製剤の例が開示されている。しかし本発明で開示されるような高濃度のTCFを含有する製剤についてはなんら開示されていない。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、医療における使用に満足しうる程度に水溶性の高められた高濃度のTCF含有製剤を提供することにある。したがって本発明は、治療上において、十分な効果を発揮するのに必要な濃度であって注射剤として投与する場合に等張性を有するTCF製剤を提供することを課題とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、TCFの難溶性の問題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、TCFの溶解性に関して以下のような特性を見出した。

(1) TCFは温度依存的な溶解性を示す。

(2) pH5~8におけるTCFの溶解性は低pH側で高い。

(3) 食塩等塩類の添加、好ましくは食塩0.3M以上の濃度において、その溶解性が著しく高まる。

(4) 中性pHかつ等張 (約300mOsm) の条件下では塩基性アミノ酸の添加で溶解性が著しく高まる。好ましくは、1.0~4.0%のアルギニンまたはリジンの添加で溶解性が著しく高まる。

【0006】本発明のTCF製剤は、注射剤として調製した場合に、TCFを注射液1mlあたりに5mg以上を含有し、さらに溶解補助剤として塩基性アミノ酸及び/または無機塩、有機塩を生体と等張になる濃度含有している。本発明の製剤は、使用時溶解する製剤の場合は上記の溶解補助剤がTCFと均質に混合されていることが必要である。このため、目的とする濃度のTCFを含有する溶液を調製し、この溶液をそのままバイアル瓶やアンプルに封入するか、あるいは凍結乾燥製剤とする。このような製剤を調製するためには、TCFの高濃度含有溶液を調製する必要がある。TCFは上述したように水には難溶であり、TCFの溶解度を上げるためには、pHを6以下の酸性条件とするか、あるいは食塩濃度を0.3M以上に上げる必要がある。しかし、注射液のp

目を酸性にすることは注射の際の痛みの原因となるため好ましくない。また食塩濃度を高くすることは注射溶液の浸透圧を高くすることであり好ましくない。浸透圧を生体の浸透圧と同じにするためには、食塩水溶液であれば0.15Mの濃度とすることで等張性を保つことができる。この場合の溶液の浸透圧は約300mOsmである。しかしこの濃度の塩溶液ではTCFは1mg/ml程度しか溶解しない。これを10mg/ml程度まで溶解させるためには塩濃度を0.3M以上とする必要がある。この場合、浸透圧は600mOsm以上となる。TCFを10mg/ml以上の濃度に溶解させ、さらに浸透圧を生体と等張とするためには、複数の溶解補助剤を使用する必要がある。

【0007】溶解補助剤としては塩基性のアミノ酸またはその酸付加塩またはこれらアミノ酸類と有機塩または無機塩とを併用することができる。塩基性のアミノ酸としてはアルギニンあるいはリジンが好ましく、これらのアミノ酸の酸付加塩を用いることもできる。これらのアミノ酸をそれぞれ、アミノ酸換算で3~4%含有する溶液は、ほぼ生体と等張性の溶液となる。この溶液にはTCFが10~20mg/mlの濃度で溶解する。さらに、これらの塩基性アミノ酸またはその酸付加塩と有機塩及び無機塩からなる群から選ばれる1以上の塩とを組み合わせて使用することもできる。例えば、アミノ酸の濃度を1.5~1.75%として、これに薬理上許容される有機塩または無機塩を加えることにより、等張性を維持することができる。有機塩としてはクエン酸ナトリウムまたは乳酸ナトリウムを例示できる。また無機塩としては食塩、リン酸水素ナトリウムまたは炭酸水素ナトリウムを例示できるが、とくに食塩が好ましい。このように塩基性アミノ酸と塩とを併用した場合にはTCFとして5~10mg/mlを溶解させることができる。このようにしてTCFを溶解した溶液はそのまま、滅菌し、バイアル瓶やアンプルに封入することにより注射剤として使用することができる。また凍結乾燥を行い、凍結乾燥製剤とすることもできる。凍結乾燥製剤とする場合は、TCFは高濃度の塩基性アミノ酸水溶液や、塩溶液に溶解しやすいため塩基性アミノ酸や、塩を等張濃度の約2倍程度の濃度（塩基性アミノ酸であれば7%以上の濃度、塩基性アミノ酸と塩であれば、塩基性アミノ酸4%、塩0.15M）の溶液を調製し、これにTCFを目的濃度の2倍程度の濃度に溶解し凍結乾燥し、凍結乾燥製剤とすることもできる。このような操作を行うことにより、凍結乾燥に要する時間やエネルギーを節減することもできる。このようにして調製した凍結乾燥製剤は溶解時の約2倍量の注射用蒸留水で溶解することにより等張性の筋注、静注等の注射液として使用することができる。本発明におけるTCF製剤あるいは注射液には、このような凍結乾燥製剤も含まれる。

【0008】TCFはガラスや合成樹脂に吸着されやす

い特性を有しており、上記の溶解補助剤の他に界面活性剤や吸着防止剤、安定化剤などを使用しても良い。界面活性剤としてはツイーン20 (tween 20)、ツイーン80 (tween 80)、ツイーン100 (tween 100)などを例示することができる。また吸着防止剤、安定化剤としてはWC91/10651に開示されているアルブミン、ヒト血清、ゼラチン、ソルビトール、マンニトール、キシリトールなどを例示することができる。この製剤は安定でかつ長期間の保存にも耐え、高濃度のTCF投与を必要とする疾患にも十分な量のTCFを含有している。

【0009】以下に実施例、参考例を示し本発明をさらに詳細に説明する。

【実施例】本実施例ではTCF高濃度製剤の調製例を示す。尚、以下に示すすべての実施例、参考例、実験例でTCFは組換えDNA技術応用により Namalwa細胞で生産した組換え型TCF (WO92/1053に開示された方法に従って生産された γ -TCF)を使用し、TCF含有溶液は、吸着防止のため0.01% Tween 80を含有する10mMリン酸緩衝液で調製した。

(1) TCFを高濃度に含有する注射製剤

① 0.01% Tween 80および0.3M食塩を含有する無菌で且つピロジェンフリーの10mMリン酸緩衝液 (pH7) にTCFを20mg/mlとなるように溶解し、TCF含有溶液を調製した。

②食塩は含有せず、2.33% L-Arg·HCl を含有する無菌で且つピロジェンフリーの10mMリン酸緩衝液 (pH7)を同様に調製し、この溶液と①のTCF含有溶液とを3:1で混和した。溶解後0.22 μ mのフィルターで無菌ろ過した後アンプル瓶に1mlずつ分注し、密封した。このようにして調製した溶液はTCFを5mg/ml含有する高濃度溶液であり、0.075M食塩および1.75% L-Arg·HCl を含有するので、中性pH且つ等張の水溶液であり、従って注射製剤として最適である。更に、この注射製剤は室温および低温下の保存においても白濁を生じず、所定のTCF含量を維持した安定な注射製剤である。

【0010】(2) TCFを高濃度に含有する注射製剤 3.5% DL-アルギニン塩酸塩および0.01% Tween 80(を含有する無菌でかつピロジェンフリーの10mMリン酸緩衝液 (pH7)を調製し、この溶液に10mg/mlになるようにTCFを加え、溶解させた。この溶液を無菌ろ過した後バイアル瓶に1mlずつ分注し密栓を行った。このようにして調製した溶液はTCFを10mg/ml含有する高濃度溶液であり、中性pH、且つ等張の水溶液であり、従って注射製剤として最適である。更に、この注射製剤は室温および低温下の保存においても白濁を生じず、所定のTCF含量を維持した安定な注射製剤である。

【0011】

(3) TCFを高濃度に含有する注射製剤の製法

3. 0% L-リジン塩酸塩および0.01% Tween 80を含有する無菌かつパイロジェンフリーの10 mMリン酸緩衝液(pH 7)を調製し、この溶液に10 mg/mlになるようにTCFを加え、溶解させた。この溶液を無菌ろ過した後バイアル瓶に1 mlずつ分注し密栓を行った。本製法で調製した溶液はTCFを10 mg/ml含有する高濃度溶液であり、中性pH、且つ等張の水溶液であり、従って注射製剤として最適である。更に、この注射製剤は室温および低温下の保存においても白濁を生じず、所定のTCF含量を維持した安定な注射製剤である。

【0012】

(4) TCFを高濃度に含有する凍結乾燥注射製剤
7. 0% DL-アルギニン塩酸塩および0.02% Tween 80を含有する無菌かつパイロジェンフリーの10 mMリン酸緩衝液(pH 7)を調製し、この溶液に10 mg/mlになるようにTCFを加え、溶解させた。この溶液を無菌ろ過した後バイアル瓶に1 mlずつ分注し、凍結乾燥を行ない密栓した。この製剤は使用時に2 mlの注射用蒸留水に溶解することによりTCFを5 mg/ml含有する安定で且つ中性pHで等張な注射液とすることができる。

【0013】

【試験例1】以下に試験例としてTCFの溶解性の試験について説明する。本試験によりTCFの製剤を調製するに必要な溶解性に関する知見が得られた。

(1) TCFの溶解度の評価方法

TCFをポリプロピレン製チューブに秤量し、種々の濃度の食塩、アミノ酸或いはそれらの複数を含有する溶解液を添加後、直ちにチューブを一定温度に保持し、第12改正日本薬局方・通則24に従って30分間攪拌操作を行いTCFを溶解した。溶解後直ちに超遠心分離(30,000×G、30分間、一定温度)を行い、TCF飽和溶液と未溶解TCFを完全に分離した。得られた飽和溶液中のTCF濃度をLowry-Follin法により定量し、TCFの溶解度を求めた。

【0014】(2) TCFの溶解度に及ぼすpHの影響
0.15M食塩含有或いは非含有の種々のpHの溶解液を調製し、5℃および20℃におけるTCFの溶解度を(1)の方法で検討した結果を表1に示した。いずれの場合も、pH 7以下でTCFの溶解度は顕著に増加した。

【0015】

【表1】

pH	0M 食塩	0.15M 食塩	
	20℃	5℃	20℃
5.5	1.9	5.6	15.0
6.0	1.0	2.8	12.4
6.5	0.6	1.7	6.5
7.0	0.4	1.2	4.9
7.5	—	—	4.6
8.0	—	—	4.8

* 溶解度は mg/ml で表示した。

【0016】

(3) TCFの溶解度に及ぼす食塩濃度の影響
種々の濃度の食塩を含有する溶解液(pH 6、pH 6.5、pH 7)を調製し、20℃におけるTCFの溶解度を(1)の方法で検討した結果を表2に示した。何れの場合も、食塩濃度を0.15Mから0.3Mにした場合、TCFの顕著な溶解度の増加を認めた。一方、0.3Mから1.2Mに食塩濃度を上げた場合には、TCFの溶解度はやや増加するだけであった。

【0017】

【表2】

食塩濃度	pH		
0M	6.0	6.5	7.0
0	1.0	0.6	0.4
0.15	12.4	6.5	4.9
0.3	53.7	51.4	49.4
1.2	62.1	57.5	53.9

* 溶解度は mg/ml で表示した。

【0018】(4) TCFの溶解度に及ぼす温度の影響
0.15M或いは0.3M食塩を含有する溶解液(pH 6、pH 6.5、pH 7)を調製し、種々の温度におけるTCFの溶解度を(1)の方法で検討した結果を表3に示した。何れの場合も、温度上昇に依存したTCFの溶解度の増加を認めた。

50 【0019】

【表3】

温 度 (℃)	0.15M 食塩			0.3M 食塩		
	pH6.0	pH6.5	pH7.0	pH6.0	pH6.5	pH7.0
5	2.8	1.7	1.2	50.6	39.2	37.0
20	12.4	6.5	4.9	53.7	51.4	49.4
40	32.9	31.1	30.0	60.7	59.7	58.7

* 溶解度は mg/ml で表示した。

【0020】
 (5) TCFの溶解度に及ぼす溶解補助剤の効果
 溶解補助剤として種々のアミノ酸を使用し、TCFの医薬品製剤としての使用を考慮し生理的条件下とするため、溶解補助剤単独および溶解補助剤と食塩とで浸透圧

比を300mOsm付近に調製した中性(pH6.8～7.2)の溶解液を調製し、5℃におけるTCF溶解度を(1)の方法で検討した結果を第4表に示した。

【0021】

【表4】

アミノ酸	濃度	0M 食塩	0.075M 食塩	0.15M 食塩
				1.2
L-Gly	2 % 1 %	1.0	3.0	
L-Ala	2.5 % 1.25 %	1.5	3.2	
L-Ser	3 % 1.5 %	1.0	1.9	
L-Met	4 % 2 %	1.2	2.0	
L-Pro	3 % 1.5 %	1.4	3.0	
L-Asp · Na · H ₂ O	3 % 1.5 %	5.3	3.4	
L-Glu · Na · H ₂ O	3 % 1.5 %	4.7	3.3	
L-Arg · HCl	3.5 % 1.75 %	18.4	7.6	
D-Arg · HCl	3.5 % 1.75 %	21.7	10.3	
DL-Arg · HCl	3.5 % 1.75 %	21.7	8.5	
L-Lys · HCl	3 % 1.5 %	10.4	6.9	
L-His	4 % 2 %	3.5	3.2	

* 溶解度は mg/ml で表示した。

【0022】L-グリシン等の中性アミノ酸は、1%~4%において、無添加に比べて若干の溶解度の増加にとどまり、いずれも顕著な溶解補助効果は認められなかった。また、L-アスパラギン酸・Na・H₂O等の酸性アミノ酸も、3%~1.5%において無添加に比べて3~4倍程度の溶解度を得るにとどまり、いずれも顕著な溶解補助効果は認められなかった。一方、塩基性アミノ酸の場合、L-アルギニンでは、1.75%~3.5%においてアミノ酸の濃度に依存した顕著なTCFの溶解度の増加を認め、無添加に比べて5~15倍の溶解度の増加が認められた。しかもアルギニンはL体、D体またはラセミ体のいずれにおいても同等の溶解補助効果が認められた。L-リジンも同様に1.5%~3%において含有量に依存した顕著なTCFの溶解度の増加を認めた。しかしL-Hisでは、2%~4%において、無添加に比べて約3倍程度の溶解度の増加を認めたに過ぎなかった。顕著な溶

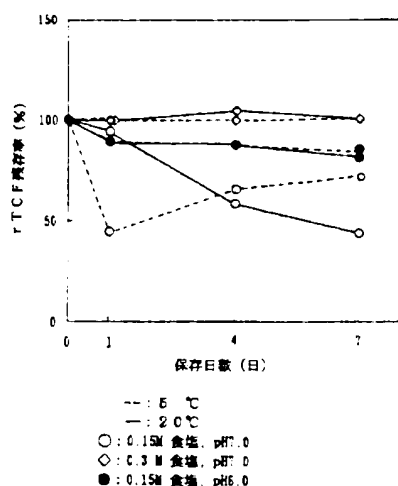
解補助効果は認められなかった。本発明で提供されるTCF製剤は、塩基性アミノ酸、食塩等を溶解補助剤として用いることにより、中性pHの等張水溶液では1mg/ml以下の濃度の製剤しか調製できないのに対して、10mg以上の高濃度の製剤を調製することが可能となる。

【0023】

【試験例2】また本発明で使用した塩基性アミノ酸はTCFの保存安定性にも効果を有している。以下に試験例を示し、この保存安定性に及ぼす効果を説明する。本試験例においては種々の添加剤のTCF製剤の保存安定性に及ぼす効果について示す。食塩、L-Arg·HClあるいは両者を含有する溶解液にヒト血清アルブミン(HSA)及びD-マンニトールを添加した溶液を調製し、これを用いて、室温にてTCFを溶解し、約1mg/mlのTCFを含有する溶液を調製した。各TCF製剤の溶

液を濾過滅菌 ($0.22 \mu\text{m}$) し、滅菌済のポリプロピレンチューブに分注した。各チューブを 5°C 或いは 20°C に保持し、1日、4日、7日経過後の試料について (1) の方法で遠心分離し、上清中の TCF 濃度を Lowry-Follin 法および特開平 5-97 に開示された TCF 抗体を用いた免疫学的活性測定法 (ELISA) により定量し、TCF の残存量を算出し、その安定性を評価した。測定結果は、保存開始時の TCF 量を 100 とした相対値で示した。測定結果を図 1、図 2、図 3 に示した。図 2 に示すように本発明の L-Arg・HCl を溶解補助剤として添加した製剤の溶液は安定性が増していること

【図 1】



が判明した。

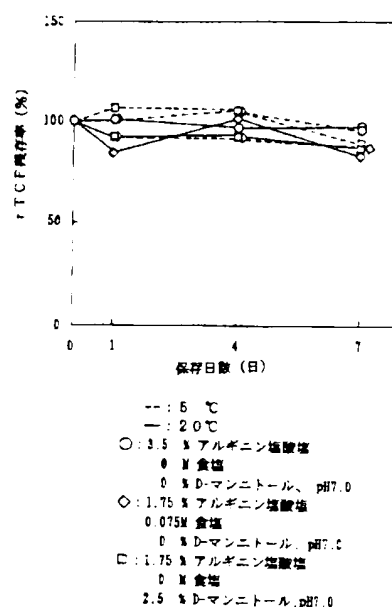
【図面の簡単な説明】

【図 1】 TCF に溶解補助剤として食塩を用いた場合の保存安定性を示す。

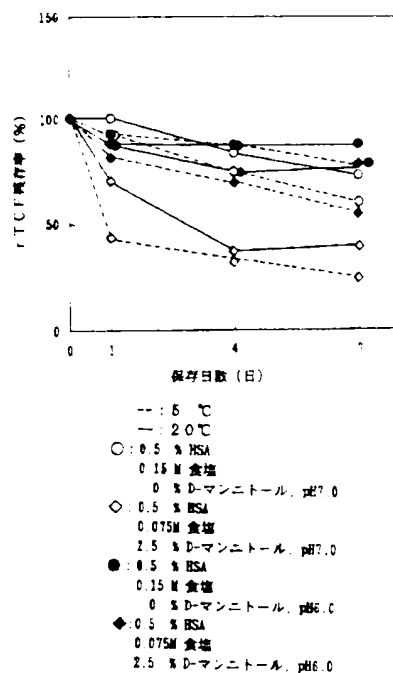
【図 2】 TCF 溶解補助剤として L-アルギニン塩酸塩、食塩を用い、安定剤として D-マンニトールを用いた場合の保存安定性を示す。

【図 3】 TCF に溶解補助剤として食塩を用い、安定剤としてヒト血清アルブミン (HSA)、D-マンニトールを用いた場合の保存安定性を示す。

【図 2】



【図3】



フロントページの続き

(72)発明者 熊沢 栄太郎

栃木県河内郡南河内町大字薬師寺3219-1

グリーンタウン59-1-4